

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kristina Rylova

STANOVENÍ VYBRANÝCH PRVKŮ V ROSTLINNÉM MATERIÁLU METODOU  
ATOMOVÉ SPEKTROMETRIE

Determination of selected elements in plant materials using atomic  
spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne: 17.08.2016

Kristina Rylova

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za pomoc a podporu během studia.

## **Abstrakt**

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení prvků Se, Zn, Ca a Mg v rostlinných vzorcích použitím metody atomové absorpční spektrometrie s dvěma různými způsoby atomizace.

Pro stanovení výše zmíněných prvků v reálných vzorcích byly provedeny optimalizace obou metod. Pro plamenovou atomizaci byla provedena optimalizace výšky hořáku, která se obecně pohybovala mezi 6 - 7 cm, a průtok acetylenu, vzduchu a oxidu dusného. Byla také nastavena poloha výbojky s dutou katodou. Pro metodu atomové absorpční spektrometrie s chemickou generací těkavých hydridů byly provedeny optimalizace koncentrace kyseliny chlorovodíkové, koncentrace tetrahydridoboritanu sodného a rychlosti průtoku vzorku. Za nalezených optimálních podmínek byly naměřeny charakteristiky metody, které popisují metodu stanovení jednotlivých prvků. Mez detekce byla pro selen  $0,496 \mu\text{g L}^{-1}$ , pro zinek  $6,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , pro vápník  $15,51 \mu\text{g L}^{-1}$  a pro hořčík  $2,47 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Optimální podmínky byly také použity ke stanovení prvků v reálných vzorcích, které byly připraveny rozkladem rostlinných částí v mikrovlnném zařízení v přítomnosti kyseliny dusičné. Vzorky byly naředěny tak, aby poskytovaly měřitelnou odezvu a k některým byl navíc přidán pomocný roztok chloridu draselného. Metodou atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací byl stanoven zinek, vápník a hořčík, metodou atomové absorpční spektrometrie s chemickou generací těkavých hydridů byl stanoven selen. Výsledky stanovení, uvedené v jednotkách  $\text{mg L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , poskytují informaci o tom, ve kterých rostlinách bylo nalezeno největší zastoupení daných prvků.

## **Klíčová slova**

Atomová absorpční spektrometrie, plamenová atomizace, chemické generování těkavých hydridů, rostlinné materiály, rozklad, selen, vápník, zinek, hořčík

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis was to determine the elements Se, Zn, Ca and Mg in plant samples using atomic absorption spectrometry with two different types of atomization. The both methods has been optimized for the determination of these elements. Optimization of a burner height which generally ranged between 6.0 and 7.0 cm and optimization of the flow rate of acetylene, air and nitrous oxide was needed for the method using flame atomization. It also has been set location of the hollow cathode lamp. Optimization of dilution of hydrochloric acid, the concentration of sodium borohydride and the flow rate of the sample was needed for the method of atomic absorption spectrometry with the chemical generation of volatile hydrides. Optimal conditions, which were found, were used for measurement method performance which are describe the method for the determination of individual elements. The limit of detection for selenium was  $0,496 \mu\text{g L}^{-1}$ , for zinc was  $6,01 \mu\text{g L}^{-1}$ , for calcium was  $15,51 \mu\text{g L}^{-1}$  and for magnesium was  $2,47 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Optimal conditions were also used for determination of the elements in real samples which were prepared by decomposition of plant materials with nitric acid in a microwave oven. Samples were diluted to provide a measurable response and the auxiliary solution of potassium chloride was added to the some of them. Zinc, calcium and magnesium were determined by using atomic absorption spectrometry with flame atomization and selenium was determined by using atomic absorption spectrometry with the chemical generation of volatile hydrides. The results are introduced in units of  $\text{mg L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$  and they provide the information of the largest amount of individual elements found in the plant samples.

## **Keywords**

Atomic absorption spectrometry, flame atomization, chemical generation of volatile hydrides, plant materials, decomposition, selenium, calcium, zinc, magnesium

## Obsah

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Stanovované prvky .....	9
2.1.1	Selen .....	9
2.1.2	Zinek.....	9
2.1.3	Vápník .....	10
2.1.4	Hořčík .....	10
2.2	AAS s plamenovou atomizací.....	10
2.2.1	Instrumentace.....	11
2.2.2	Zdroje primárního záření .....	12
2.2.3	Plamenová atomizace (F-AAS).....	13
2.2.4	Monochromátor .....	14
2.2.5	Uspořádání optického systému.....	15
2.2.6	Interference v AAS .....	16
2.3	AAS s chemickým generováním těkavých hydridů .....	17
2.3.1	Generování a atomizace těkavých sloučenin.....	17
3	Experimentální část.....	18
3.1	Pomůcky a přístroje .....	18
3.2	Chemikálie .....	19
3.3	Analyzované vzorky a jejich příprava .....	19
3.4	Měření standardů a vzorků .....	20
3.4.1	Příprava roztoků .....	20
3.4.2	Měření pomocí F-AAS .....	21
3.4.3	Měření pomocí HG-AAS .....	23
3.5	Statistické zpracování výsledků.....	24
4	Výsledky a diskuze.....	26
4.1	Stanovení Zn, Ca a Mg technikou F-AAS .....	26
4.1.1	Optimalizace výšky hořáku .....	26
4.1.2	Kalibrační závislosti pro Mg, Ca a Zn.....	27
4.1.3	Charakteristika metody.....	29
4.2	Stanovení selenu technikou HG-AAS .....	30
4.2.1	Optimalizace metody .....	30
4.2.2	Kalibrační závislost .....	32
4.2.3	Charakteristika metody.....	33
4.3	Stanovení vzorků .....	34
5	Závěr.....	37
6	Zdroje .....	38

## Seznam zkratek

$A$  – absorbance

AAS – atomová absorpční spektrometrie

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

$c$  – koncentrace [ $\text{mg L}^{-1}/\mu\text{g L}^{-1}/\%$ ]

DNA – deoxyribonukleová kyselina

F-AAS – atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací

$h$  – výška hořáku [cm]

HG-AAS – atomová absorpční spektrometrie s hydridovou generací

$I$  – napájecí proud výbojky [mA]

$L_{1,2}$  – interval spolehlivosti

LDR – lineární dynamický rozsah

LOD – mez detekce

LOQ – mez stanovitelnosti

psi – jednotka tlaku,  $1 \text{ psi} = 6,895 \text{ Pa} = 0,0689 \text{ bar}$

$R$  - rozpětí

RNA – ribonukleová kyselina

$s$  – směrodatná odchylka

$s_r$  – relativní směrodatná odchylka

$\sigma$  – směrodatná odchylka

$t$  – teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$u$  – průtoková rychlost [ $\text{mL min}^{-1} / \text{L hod}^{-1}$ ]

$\nu$  – šířka spektrálního intervalu [nm]

$\tilde{x}$  - medián

$\bar{x}$  – aritmetický průměr

# 1 Úvod

Rostliny jsou zdrojem mnoha esenciálních prvků, jejichž pravidelný doporučený denní příjem je pro organismus nezbytný. Jedná se především o prvky makrobiogenní (H, O, C, N, P), mikrobiogenní (Cu, Zn, Co, Mn, I, Mo), oligobiogenní (Ca, Mg, S, Na, K, Fe) a stopové prvky (Se, B, V, Si, Li, As, Br).<sup>1</sup> Nedostatek těchto prvků nebo jejich velký nadbytek v organismu záleží pouze na složení stravy a množství těchto minerálů v půdě. Nedostatek esenciálních prvků způsobuje problémy s funkcí imunitního systému, nervového systému, řídnutím kostí apod. Jejich podávání může naopak pomoci v prevenci nebo léčbě onemocnění, které s esenciálními prvky přímo nesouvisí. Například selen pomáhá v prevenci rakoviny.<sup>2</sup> Cílem této práce bylo stanovení obsahu selenu, hořčíku, zinku a vápníku v 18 extraktech léčivých rostlin pomocí atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou (HG-AAS) a plamenové atomové absorpční spektrometrie (F-AAS). Dalšími cíli této práce byly optimalizace podmínek měření vybraných prvků.

Metoda atomové absorpční spektrometrie je běžně užívaná analytická metoda pro prvkové stanovení látek v roztoku. Výhoda obou metod, atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou i plamenové atomové absorpční spektrometrie, je použití speciálních zdrojů poskytujících záření o vlnové délce specifické pro stanovovaný prvek. Nevýhoda je, že během jednoho měření lze stanovit pouze jeden prvek. Obě metody jsou srovnávací, stanovení je založeno na porovnání signálu stanovovaného analytu se signály standardů.<sup>3</sup>



## 2 Teoretická část

### 2.1 Stanovované prvky

#### 2.1.1 Selen

Selen patří z hlediska výskytu v živých organismech do skupiny označované jako stopové prvky<sup>1</sup>. Vyskytuje se hojně v rostlinách a jeho účinky na organismus závisí na tom, jak velkým koncentracím byl organismus vystaven.

V malých množstvích je selen pro život nezbytně důležitý. Má antioxidační účinky, pomáhá v prevenci rakoviny, podporuje imunitní funkci organismu a je důležitý pro kardiovaskulární systém a pohlavní vývoj. V lidském těle ho můžeme najít zejména ve formě selenomethioninu, selenocysteinu, selenátu, selenitu a Se-methylselenocysteinu, které se v enterocytech přeměňují na  $\text{SeH}_2$ . V játrech potom syntézou vzniká selenoprotein P (SePP), jehož antioxidační účinky se uplatňují zejména ve štítné žláze, kde spolu s  $\text{H}_2\text{O}_2$ , potřebnému k syntéze hormonů štítné žlázy, vznikají i kyslíkové radikály.<sup>4</sup> Selen je nesmírně důležitý pro mozek, kde při jeho vyčerpání dochází k nevratnému poškození. Proto se v mozku udržuje určitá hladina selenu na úkor jiných tkání.<sup>5</sup> Ve vyšších koncentracích (okolo 750 – 1000  $\mu\text{g}$  denně) může být selen pro lidský organismus toxický<sup>4,6</sup>. Příjem selenu potravou je ovlivněn obsahem selenu v půdě, který se liší v závislosti na její geografické poloze. Ve střední Evropě je obsah selenu v půdě poměrně nízký.<sup>7</sup>

#### 2.1.2 Zinek

Zinek je esenciální prvek, který se vyskytuje ve všech rostlinách i živočiších. Je velmi důležitý především v období těhotenství, zajišťuje správný vývoj dítěte, podporuje funkci imunity, rozvoj nervové soustavy, hojení ran a srážlivost krve. Dále je velmi důležitý pro zdraví naší kůže, zubů, kostí, vlasů, nehtů a svalů.<sup>8,9</sup> Terapeutické podání zinku osobám se sníženým obsahem zinku v těle snižuje pravděpodobnost předčasného porodu a při průjemových a akutních respiračních onemocněních snižuje dobu léčby a intenzitu onemocnění.<sup>10</sup> V těle dospělého člověka je přibližně 1,5 – 2,5 g zinku, z nichž se většina, přibližně 90 %, nachází uvnitř buněk svalů, jater, plic, kůže a kostí. Méně než 0,2 % zinku se nachází v krevní plasmě vázaný na albumin,  $\alpha_2$  – mikroglobulin a oligopeptidy. Akutní toxicitu lze pozorovat při požití přibližně 1 g dávky a jejím projevem je nevolnost, zvracení, průjem a horečka.<sup>11</sup>

### 2.1.3 Vápník

Vápník je pátý nejrozšířenější prvek v zemské kůře a je velmi důležitý pro správnou funkci organismu. Je velmi důležitý v období růstu, kdy je zodpovědný za správný vývin kostí a zubů. Volný vápník se podílí na procesech uvnitř buňky a na mechanismu srážení krve.<sup>12</sup> Vázaný vápník, přibližně 99 %, se vyskytuje v zubech a kostech ve formě hydroxyapatitu. V krevní plazmě je obsah  $\text{Ca}^{2+}$  iontů velmi malý, přibližně 0,03% z celkového obsahu vápenatých iontů v organismu. V intracelulárním prostoru buněk je ATP-dependentními  $\text{Ca}^{2+}$  pumpami P-typu udržována velmi nízká koncentrace volných vápenatých iontů (asi  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ). Vápník hraje důležitou úlohu při kontrakci svalových buněk. Na jejich povrchu se nachází sarkoplasmatické retikulum, ve kterém se hromadí volné  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které jsou dále využity pro kontrakci svaloviny.<sup>13</sup>

### 2.1.4 Hořčík

Hořčík se vyskytuje v rostlinách především jako součást chlorofylu. V lidském těle se nachází především v kostech a v intracelulárním prostoru buněk. V kostech je obsaženo přibližně 67 % a v buňkách asi 31 % z celkového množství  $\text{Mg}^{2+}$  v organismu. V krevním séru se hořčík vyskytuje v mnohem menší míře (asi 1-2 %) ve dvou formách, vázaný na proteiny a volný. V intracelulárním prostoru buňky se váže na ATP, proteiny, RNA, DNA citrát a ADP a je důležitým kofaktorem enzymů energetického metabolismu. Nedostatek hořčíku může způsobit zmatenost, halucinace, křeče, svalovou slabost nebo srdeční arytmii. Při nadbytku hořčíku dochází k zablokování výlevu acetylcholinu, což má za následek blokaci nervosvalového přenosu signálu. Fyziologická koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  v séru se pohybuje v rozmezí  $0,62 - 0,91 \text{ mmol L}^{-1}$ . Při překročení koncentrace  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  se začínají projevovat příznaky intoxikace od ospalosti, přes kóma, až po zástavu srdce, v závislosti na velikosti koncentraci  $\text{Mg}^{2+}$  v séru. Terapeutické podávání hořčíku se uplatňuje v prevenci diabetu 2. typu, rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění.<sup>12,14,15</sup>

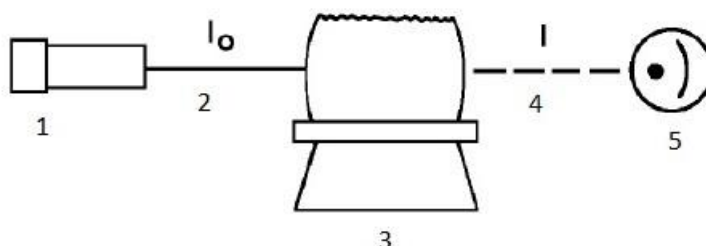
## 2.2 AAS s plamenovou atomizací

Každý atom je složen z jádra a elektronového obalu atomu, ve kterém se nachází elektrony v různých energetických hladinách. Elektrony atomového obalu jsou schopny při průchodu elektromagnetického záření energií buď přijímat (absorbovat), nebo vyzařovat (emitovat). Emise záření probíhá na základě excitace elektronu, díky přijaté energii přeskóčí elektron na energeticky vyšší hladinu, a jeho následným spontánním přeskokem na energeticky nižší hladinu. Absorpce je proces, při kterém atom nebo molekula interaguje se

zářením o dané energii a podle počtu energetických stavů absorbuje záření o různých vlnových délkách. Soubor vlnových délek, které daná látka absorbuje, se nazývá absorpční spektrum, které je charakteristické pro každou látku. Je tedy kvalitativním ukazatelem. Míra absorpce elektromagnetického záření látkou je naopak ukazatelem kvantitativním a vyjadřuje se v jednotkách absorbance,  $A$ , pro kterou platí tento vztah,

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

kde  $I_0$  je intenzita původního záření a  $I$  je intenzita prošlého záření.<sup>3</sup> Při použití metody atomové absorpční spektrometrie je důležité nejprve dodat vzorku energii k jeho disociaci na volné atomy. Disociaci lze provést pomocí nasátí vzorku do plamene. Za vhodných podmínek atomizace vzorku zůstane většina volných atomů ve svém základním stavu, což jim umožní absorbovat světlo dané vlnové délky, které poskytuje výbojka s dutou katodou (viz Obr. 2.1).<sup>16</sup>



Obr. 2.1 – Schéma procesu atomové absorpce<sup>16</sup> (převzato a upraveno)

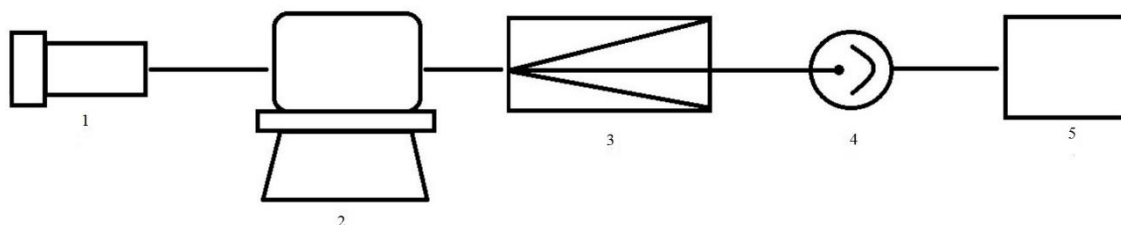
1 – zdroj záření, 2 – paprsek s intenzitou původního záření, 3 – absorpční prostředí, 4 – paprsek s intenzitou prošlého záření, 5 – detektor

Atomová absorpční spektrometrie je metoda, kterou lze stanovit i stopová množství prvků a poskytuje dostatečnou citlivost pro spoustu aplikací.<sup>17</sup> Mezi méně citlivé aplikace této metody patří atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací (F-AAS), jejíž výhody jsou nižší provozní náklady a dostupnější instrumentace.<sup>18</sup>

### 2.2.1 Instrumentace

Každý spektrometr se skládá ze zdroje záření, absorpční cely, monochromátoru, detektoru a počítače (viz Obr. 2.2). Zdroj záření musí emitovat primární záření o přesně takové vlnové délce, kterou jsou schopny stanovované atomy absorbovat.

V absorpční cele dochází, nejčastěji působením plamene, k disociaci molekul na volné atomy. Následuje monochromátor, který slouží k separaci záření o určité vlnové délce. Detektor poté přemění energii záření na měřitelný elektrický signál, který počítač vyhodnotí a na základě toho poskytne potřebná data.<sup>19,20</sup>



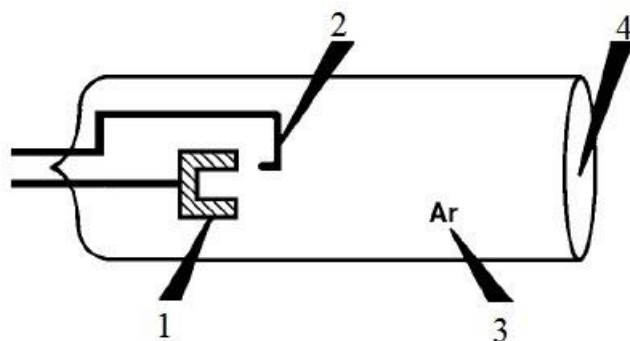
*Obr. 2.2 - Základní schéma atomového absorpčního spektrometru*

1 – zdroj záření; 2 – atomizátor, ke kterému je vzorek obvykle přiváděn zmlžovačem; 3 – monochromátor; 4 – detektor; 5 – počítač

### 2.2.2 Zdroje primárního záření

Výbojka s dutou katodou je velmi dobrý zdroj primárního záření pro většinu prvků, které lze stanovit metodou atomové absorpční spektrometrie.<sup>16</sup> Hlavní částí výbojky je dutá katoda tvořená kovem, který poskytuje záření o požadované vlnové délce v závislosti na tom, který prvek je měřen. Pro stanovení jednotlivých prvků je tedy zapotřebí používat výbojku tvořenou katodou z téhož prvku.<sup>21</sup>

Výbojka s dutou katodou je vyrobena ze skla s křemenným nebo borosilikátovým výstupním okénkem. Katoda je tvořena buď čistým kovem, pokud jsou to kovy stálé na vzduchu a mají vysoký bod tání (např. hliník), nebo kovovou folií upevněnou na pevném podkladu (např. mangan). Katoda tvořená kovovou folií na pevném podkladu se využívá zejména při stanovení více kovů naráz, jde především o katody tvořené folií z kovů Ca-Mg, Fe-Mn nebo Fe-Ni-Cr. Další součástí výbojky je anoda tvořená těžkovitelným kovem (např. Zr, Ta, Ti), která poskytuje potenciál důležitý pro vznik výboje. Prostor výbojky je naplněn inertním plynem (např. Ar, Ne).<sup>3,16,21</sup> Schéma výbojky s dutou katodou je znázorněno na *Obrázku 2.3*.



Obr. 2.3 - Schéma výbojky s dutou katodou<sup>16</sup> (převzato a upraveno)

1 – katoda, 2 – anoda, 3 – inertní plyn (argon), 4 – výstupní křemenné okénko

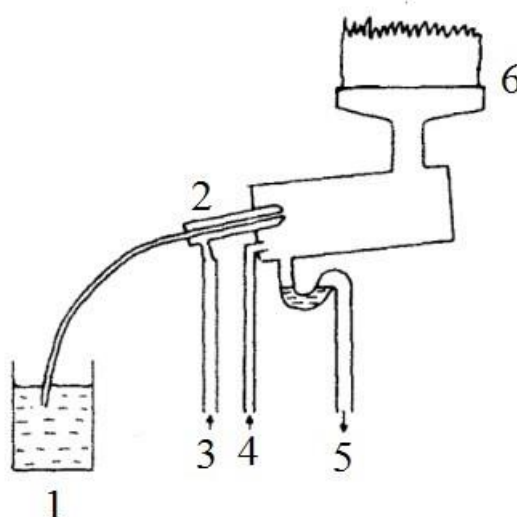
Mezi elektrody se vkládá potenciálový rozdíl několik stovek voltů, který způsobí atomizaci plynu. Pozitivně nabitě ionty plynu následně bombardují katodu a vyrážejí z ní atomy kovu, které se tak dostávají do plynné fáze. Dochází k jejich excitaci a emisi záření o charakteristické vlnové délce při přechodu atomů do základního energetického stavu.<sup>3,16</sup>

### 2.2.3 Plamenová atomizace (F-AAS)

Atomizátor je zařízení, které převádí analyzovaný prvek z roztoku vzorku do plynného atomárního stavu. Atomizaci lze provádět elektrotermicky, v křemenných atomizátorech nebo v plameni.<sup>3</sup>

Pro metodu atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací se využívá plamene, který je realizován hořící směsí paliva a oxidantu.

Jako palivo se nejčastěji používá acetylén a oxidantem bývá vzduch nebo oxid dusný. Vzorek je do plamene zaváděn pomocí pneumatického zmlžovače, který vytváří aerosol drobných kapek vzorku (viz Obr. 2.4).



Obr. 2.4 – Schéma atomizátoru<sup>22</sup> (převzato a upraveno)

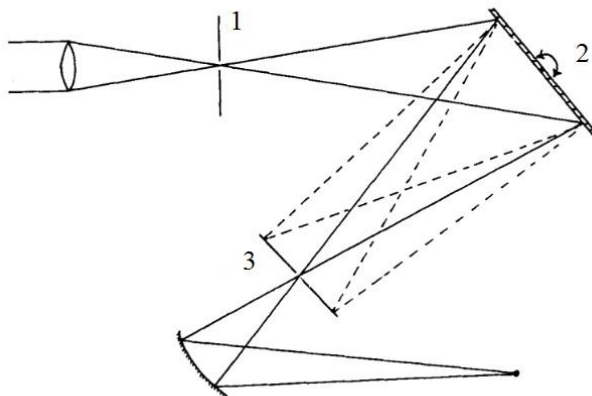
1 – vzorek, 2 – zmlžovač, 3 – oxidant, 4 – palivo, 5 – odpad, 6 – štěrbinový hořák

Účinnost pneumatických zmlžovačů je nízká (asi 10 %). K analýze se tedy využije pouze nepatrná část vzorku, protože jen malá část nasátého vzorku se přemění na aerosol a zkoumaný analyt v něm přítomný se dále naředí spalnými plyny. Z tohoto důvodu se plamenová atomizace využívá při analýze většího obsahu analytu ve vzorku.<sup>3,19</sup>

#### 2.2.4 Monochromátor

Monochromátor, slouží k separaci, izolaci a kontrole intenzity energie záření přiváděné na detektor. Ve skutečnosti monochromátor funguje jako nastavitelný filtr, který propouští pouze úzký interval spektra, který dopadne na detektor. Dokonalý monochromátor by měl být schopný propustit pouze rezonanční čáry a ostatní zcela vyloučit. Velmi důležitá charakteristika monochromátoru je jeho schopnost rozlišit dvě různé vlnové délky.<sup>22</sup>

Monochromátor má tři hlavní části: vstupní štěrbinu, difrakční mřížku a výstupní štěrbinu (viz Obr. 2.5).



Obr. 2.5 - Schéma monochromátoru<sup>22</sup> (převzato a upraveno)

1 – vstupní štěrbina, 2 – difrakční mřížka, 3 – výstupní štěrbina

Záření vycházející z výbojky s dutou katodou prochází v monochromátoru vstupní štěrbinou, která určuje, jak velké množství záření projde do monochromátoru, a dopadá na mřížku, která je schopna toto záření rozptýlit na jednotlivé vlnové délky. Otáčením mřížky se vybere požadovaný interval vlnových délek, který projde výstupní štěrbinou a dopadne na detektor.<sup>22</sup>

### 2.2.5 Uspořádání optického systému

Uspořádání optického systému využívaného v metodách AAS může být dvojího typu, jednopaprskové a dvoupaprskové.

Jednopaprskové uspořádání je poměrně jednoduché. Zdroj záření, atomizátor, monochromátor i detektor jsou zapojeny za sebou v jedné přímce. Záření generované výbojkou prochází absorpčním prostředím a jeho část se zde absorbuje v různých vlnových délkách. Monochromátor poté vybere interval vlnových délek, při kterém je citlivost stanovení nejvyšší, a ten propustí na detektor.

U dvoupaprskového uspořádání se záření vycházející z výbojky rozdělí na dva paprsky, měrný a referenční. Měrný paprsek prochází atomizátorem, zatímco referenční ne, a proto projde až na monochromátor nezměněn. Oba paprsky vykazují stejnou intenzitu, je-li základní linie nastavena na nulu. Pokud je však do plamene přiveden vzorek, dojde k absorpci záření, čímž se intenzita měrného paprsku oslabí oproti intenzitě referenčního paprsku. Přístroj poté vypočítá absorbanci.<sup>22</sup>

### 2.2.6 Interference v AAS

Interference jsou rušivé vlivy, které ovlivňují správnost naměřených dat a výsledek měření. Obecně lze interference definovat jako vliv, který je schopen způsobit odchylky ve velikosti naměřeného signálu, a lze je rozdělit na interference spektrální a nespektrální.<sup>19</sup>

Spektrální interference se v AAS vyskytují velmi zřídka. Dříve se vyskytovaly hlavně při stanovení jednoho prvku, který bude označen A, v přítomnosti jiného prvku, který bude označen B. Pokud zdroj záření obsahoval oba tyto prvky a monochromátor nebyl schopný jejich absorpční vlnové délky spolehlivě určit, mohl prvek B způsobit interferenci. U prvních výbojek to byl dobře známý jev, který lze překonat použitím alternativní absorpční čáry, protože je velice nepravděpodobné, že by dvě náhodné čáry byly stejné.<sup>22</sup>

Nespektrální interference jsou takové interference, které jsou způsobeny vlastnostmi roztoku vzorku. V roztoku může být přítomna složka, která se projeví jako rušivý prvek v matici vzorku. Při použití metody F-AAS jsou typické interference sledovány v oblasti plamene, kde může mít svůj vliv změna rychlosti sání roztoku vzorku, účinnost zmlžovače, rychlost vypařování a další, které zabraňují tvorbě atomů v základním stavu. Při stanovení hořčíku, stroncia, barya, vápníku a dalších kovů může docházet k interferencím díky působení hliníku, křemíku a fosforu, které tvoří hlinitany, křemičitany a fosfáty, což jsou termostabilní sloučeniny. Tento typ interferencí lze potlačit dvěma technikami. Použitím první techniky, která využívá chemických poznatků, lze tvorbě termostabilních sloučenin zabránit přidáním pomocného činidla. Druhá technika se týká použití plamene, který je realizován směsí acetylen-oxid dusný, což poskytuje plamen o takové teplotě, při níž jsou interference zcela potlačeny.<sup>19,22</sup>



## 2.3 AAS s chemickým generováním těkavých hydridů

V analytické chemii se generování těkavých sloučenin využívá velmi často v kombinaci s atomovou absorpční spektrometrií nebo s hmotnostní spektrometrií při stanovení stopových množství analytu. Chemické generování těkavých sloučenin je jedno z nejpoužívanějších způsobů generování těkavých sloučenin a využívá se zejména pro stanovení As, Bi, Ge, Sb, Sn, Pb, Te, Se a těkavých sloučenin rtuti s tetrahydridoboritanovými solemi.<sup>23</sup>

### 2.3.1 Generování a atomizace těkavých sloučenin

Chemické generování těkavých sloučenin je založeno na chemické reakci, při níž je analyt převeden na těkavou sloučeninu, nejčastěji hydrid, který se před atomizací oddělí od matrice vzorku. Atomizace probíhá v křemenném atomizátoru, který je umístěn v optické ose atomového absorpčního spektrometru. Převedení analytu na hydrid zajišťuje přítomnost redukčního činidla, nejčastěji  $\text{NaBH}_4$ , který je stabilizován roztokem  $\text{NaOH}$  v prostředí kyseliny, nejčastěji  $\text{HCl}$ . Generaci hydridů lze provádět dávkově, kontinuálně nebo pomocí průtokové injekční analýzy, což je jinak řečeno, dávkování analytu do proudu kyseliny. Výhodou této metody je potlačení interferencí, které by mohly vzniknout vlivem matrice, protože se plynný hydrid před vstupem do atomizátoru oddělí od kapalné matrice vzorku a je unášen nosným plynem ( $\text{Ar}$ ,  $\text{N}$ ).<sup>19</sup>

### 3 Experimentální část

#### 3.1 Pomůcky a přístroje

- Atomový absorpční spektrometr UNICAM 939 Solaar AA ovládaný softwarem Solar (Unicam, Velká Británie)
- Atomový absorpční spektrometr GBC 933AA s plamenovou atomizací (GBC Scientific Equipment, Austrálie)
- Systém pro generování hydridů VGA-76 (Varian Techtron, Austrálie)
- Zařízení pro mineralizaci vzorků pomocí mikrovlnného záření MDS 2000 (CEM Corporation, USA)
- Křemenný atomizátor odporově vyhřívaný na teplotu 930 °C (dutá trubice tvaru „T“, atomizační rameno délky 170 mm s vnitřním průměrem 12 mm a střední část délky 60 mm s vnitřním průměrem 2 mm) umístěn v externě vyhřívaném bloku (RMI, ČR)
- Výbojka s dutou katodou pro stanovení selenu,  $\lambda = 196,1$  nm,  $I = 10$  mA, (Varian Techtron, Austrálie)
- Výbojka s dutou katodou pro stanovení vápníku,  $\lambda = 422,7$  nm,  $I = 10$  mA (Varian Techtron, Austrálie)
- Výbojka s dutou katodou pro stanovení hořčíku,  $\lambda = 285,2$  nm,  $I = 10$  mA (Varian Techtron, Austrálie)
- Výbojka s dutou katodou pro stanovení zinku,  $\lambda = 213,9$  nm,  $I = 5$  mA (Varian Techtron, Austrálie)
- Hadička na průtok vzorku: GLASS EXPANSION 1.65 – BLU, PVC Pump Tube 2 tag 1,65 mm ID, Blue/Blue (PKT12), vyrobeno Austrálii
- Hadičky na průtok činidel: VARIAN PVC FLOW MEASURED PUMP TUBES 0,76 mm ID, Black/Black (PK/12)
- Spojovací materiál (SUPELCO, USA)
- TFE Teflon® Tubing 0,8 mm ID, 1 mL

### 3.2 Chemikálie

- Standardní roztok  $\text{Se}^{4+}$  v roztoku kyseliny dusičné 2% (v/v) o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$  (Český metrologický institut, Česká Republika)
- Standardní roztok  $\text{Ca}^{2+}$  v roztoku kyseliny dusičné 2% (v/v) o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$  (Astasol®, Analytika® spol.s.r.o, Česká Republika)
- Standardní roztok  $\text{Mg}^{2+}$  v roztoku kyseliny dusičné 2% (v/v) o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$  (Astasol®, Analytika® spol.s.r.o, Česká Republika)
- Standardní roztok  $\text{Zn}^{2+}$  v roztoku kyseliny dusičné 2% (v/v) o koncentraci  $1,000 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1}$  (Astasol®, Analytika® spol.s.r.o, Česká Republika)
- **HCl**: 37%, for analysis (EMSURE®, Merck spol.s.r.o, Německo)
- **NaBH<sub>4</sub>**: for the determination of hydride formers by AAS, min. 99 % čistoty, (FLUKA Analytical)
- **NaOH**: p.a. (Lach-Ner, s.r.o, Česká Republika)
- **HNO<sub>3</sub>**: 65%, for analysis (EMSURE®, Merck spol. s.r.o, Německo)
- **KCl**: p.a. (Lach-Ner, s.r.o, Česká Republika)

### 3.3 Analyzované vzorky a jejich příprava

Vzorky byly usušené, drcené léčivé rostliny nebo části těchto rostlin. Roztoky pro analýzu byly připraveny metodou rozkladu v uzavřeném systému v mikrovlnném zařízení.

Do čistých tlustostěnných nádobek na rozklad byly naváženy sušené vzorky léčivých rostlin, ke kterým bylo přidáno 5 ml 65% kyseliny dusičné. Nádobky byly dobře uzavřeny a vloženy do karuselu, který byl vložen do mikrovlnného zařízení MDS - 2000. Byl spuštěn program ROSTLINY, který má celkem 4 kroky. Rozklad vzorku probíhal po 10 minutách při tlaku 80, 100, 120 a 140 psi. Po vychladnutí byly rozložené vzorky kvantitativně převedeny do 18 uzavíratelných plastových nádobek se stupnicí označených písmeny A-Q (včetně Ň), doplněny do 15 ml deionizovanou vodou a byly ponechány otevřené 30 minut, aby došlo k vytěkání nezreagované kyseliny dusičné. Seznam vzorků včetně navážek je uveden v *Tab. 3.1*.

Tab. 3.1 - Seznam použitých léčivých rostlin včetně jejich navážek

Název rostliny	Vzorek	Navážka (g)
Hluchavka	A	0,40644
Jitrocel kopinatý	B	0,35886
Jitrocel kopinatý (listy)	C	0,37993
Lesní jahoda	D	0,35886
Levandule	E	0,35678
Máta	F	0,36444
Mateřídouška	G	0,33546
Oregáno	H	0,33421
Řebříček	I	0,38045
Řebříček (listy)	J	0,37404
Řepík	K	0,32565
Routa vonná	L	0,33120
Šalvěj	M	0,35835
Smetánka	N	0,38045
Stévie	Ň	0,35500
Vlaštovičník	O	0,35541
Routa (semena)	P	0,39810
Meduňka	Q	0,32362

### 3.4 Měření standardů a vzorků

Metodou plamenové atomové absorpční spektrometrie byl stanoven hořčík, vápník a zinek, metodou atomové absorpční spektrometrie s technikou generování těkavých hydridů byl stanoven selen.

#### 3.4.1 Příprava roztoků

##### *Kalibrační roztoky pro stanovení zinku, hořčíku a vápníku*

Pro každý stanovovaný prvek byly připraveny kalibrační roztoky naředěním roztoků standardů 0,7% kyselinou dusičnou ve 100mL odměrných baňkách. Dále byl připraven pomocný roztok KCl, který byl připraven rozpuštěním 18,8 g pevného KCl v 200 mL deionizované vody. Objem 0,4 mL pomocného roztoku KCl byl přidán k objemu 10 mL kalibračních roztoků vápníku a hořčíku a k objemu 10 mL vzorku. Koncentrace kalibračních roztoků je uvedena v Tab. 3.2.

Tab. 3.2 - Koncentrace kalibračních roztoků

Kalibrační roztok:	Koncentrace (mg L <sup>-1</sup> )			
	1	2	3	4
Mg <sup>2+</sup>	0,05	0,2	0,5	1
Zn <sup>2+</sup>	0,1	0,25	0,5	1
Ca <sup>2+</sup>	0,5	1	2,5	5
Se <sup>4+</sup>	1*	2,5*	5*	10*

\* pro Se<sup>4+</sup> v µg L<sup>-1</sup>

#### **Kalibrační roztoky pro stanovení selenu**

Pro přípravu kalibračních roztoků selenu byl připraven zásobní roztok kyseliny dusičné tak, že do 500 mL odměrné baňky bylo odměřeno 167 mL 65% kyseliny dusičné a baňka byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Dále byl připraven zásobní roztok selenu o koncentraci 1 mg L<sup>-1</sup> naředěním roztoku standardu deionizovanou vodou ve 100mL odměrné baňce. Kalibrační roztoky, jejichž koncentrace je uvedena v Tab. 3.2 byly připraveny naředěním zásobního roztoku standardu o koncentraci 1 mg L<sup>-1</sup> v 50mL odměrných baňkách připraveným zásobním roztokem kyseliny dusičné.

#### **Roztoky pro generování hydridů**

Pro stanovení selenu byly připraveny dva pomocné roztoky. Roztok tetrahydridoboritanu sodného byl připraven rozpuštěním 3 g NaBH<sub>4</sub> a 2,5 g NaOH v 500 mL deionizované vody. Dále byl zředěním deionizovanou vodou připraven 18% pomocný roztok HCl.

### **3.4.2 Měření pomocí F-AAS**

#### **Stanovení zinku pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací**

Pro stanovení zinku byly použity standardy a vzorky bez přidání pomocných činidel. Na přístroji GBC 933 AA byla pro stanovení použita zinková výbojka a byly nastaveny parametry uvedené v Tab. 3.3.

Tab. 3.3 - Parametry přístroje pro stanovení zinku

Parametry přístroje	
vlnová délka	213,9 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
napájecí proud výbojky	5 mA
průtok acetylenu	2 l/h
průtok vzduchu	8 l/h

### ***Stanovení vápníku pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací***

Pro stanovení vápníku byly použity standardy a vzorky s přidáním pomocného činidla KCl. Na přístroji GBC 933 AA byla pro stanovení použita vápníková výbojka a byly nastaveny parametry uvedené v *Tab. 3.4*.

*Tab. 3.4 - Parametry přístroje pro stanovení vápníku*

<b>Parametry přístroje</b>	
vlnová délka	422,7 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
napájecí proud výbojky	10 mA
průtok acetylenu	2 l/h
průtok oxidu dusného	8 l/h

### ***Stanovení hořčíku pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací***

Pro stanovení hořčíku byly použity standardy a vzorky s přidáním pomocného činidla KCl. Na přístroji GBC 933 AA byla pro stanovení použita hořčíková výbojka a byly nastaveny parametry uvedené v *Tab. 3.5*.

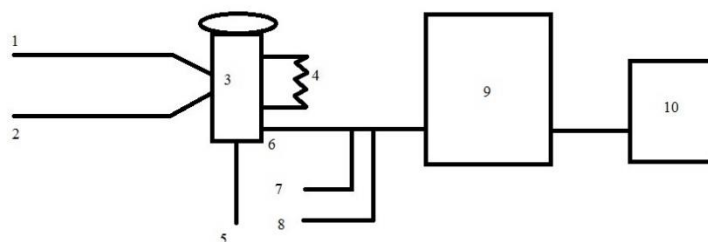
*Tab. 3.5 - Parametry přístroje pro stanovení hořčíku*

<b>Parametry přístroje</b>	
vlnová délka	285,2 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
napájecí proud výbojky	10 mA
průtok acetylenu	2 l/h
průtok vzduchu	8 l/h

### 3.4.3 Měření pomocí HG-AAS

#### *Aparatura pro generování hydridů*

Pro stanovení selenu byla použita metoda atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou. Před měřením standardů a vzorků byla proto sestavena aparatura na generování hydridů, jejíž schéma je znázorněno na *Obr. 3.1.*



*Obr. 3.1. - Schéma aparatury pro stanovení  $\text{Se}^{4+}$  technikou HG – AAS*

1 – přívod vzorku do cívky, 2 – přívod HCl, 3 – šesticestný ventil, 4 – cívka se vzorkem, 5 – odpad, 6 – přívod vzorku a HCl z ventilu do atomizátoru, 7 – přívod  $\text{NaBH}_4$ , 8 – přívod nosného plynu (Ar), 9 – měřicí přístroj s křemenným atomizátorem, 10 – počítač

#### *Stanovení selenu pomocí atomové absorpční spektrometrie hydridovou technikou*

Všechna měření probíhala na přístroji UNICAM 939 AA. Ke stanovení selenu touto metodou byly použity pomocné roztoky  $\text{NaBH}_4$  a HCl, jejichž příprava je uvedena v *kap. 3.4.1.* Parametry přístroje jsou uvedeny v *Tab. 3.6.* Systém pro generování hydridů VGA-76 poskytoval průtok argonu rychlostí  $5 \text{ L hod}^{-1}$ .

*Tab. 3.6 - Parametry přístroje UNICAM 939 AA*

Parametry přístroje	
vlnová délka	196,1 nm
šířka spektrálního intervalu	0,5 nm
napájecí proud výbojky	10 mA
teplota atomizátoru	950°C

### 3.5 Statistické zpracování výsledků

Pro zajištění dostatečné přesnosti statistického vyhodnocení byla všechna měření prováděna minimálně třikrát.

#### **Medián, $\tilde{x}$**

Medián je střední hodnota naměřených výsledků. Pro lichý počet výsledků se medián získá jejich seřazením od nejmenšího po největší, přičemž medián bude hodnota nacházející se přesně uprostřed této řady. Pro sudý počet výsledků je postup stejný až na to, že medián je aritmetickým průměrem dvou prostředních hodnot. Medián se používá pro počet měření  $n < 20$ .

#### **Aritmetický průměr, $\bar{x}$**

Aritmetický průměr je součet všech hodnot daného souboru vydělený jejich počtem.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

#### **Rozpětí výsledků, $R$**

Rozpětí výsledků je rozdíl mezi největší a nejmenší hodnotou daného souboru.

$$R = x_{max} - x_{min}$$

#### **Směrodatná odchylka, $s$**

Pro počet paralelních stanovení  $n < 20$  se směrodatná odchylka počítá podle vzorce:

$$s = k_n \cdot R$$

#### **Relativní směrodatná odchylka, $s_r$**

Relativní směrodatná odchylka je podíl směrodatné odchylky a mediánu.

$$s_r = \frac{s}{\tilde{x}}$$



**Interval spolehlivosti,  $L_{1,2}$** 

Interval spolehlivosti udává interval, ve kterém leží skutečná hodnota výsledku s pravděpodobností 95 %.

$$L_{1,2} = K_n \cdot R$$

Výsledek se udává ve tvaru:  $\tilde{x} \pm L_{1,2}$

**Mez detekce, LOD**

Mez detekce je minimální koncentrace stanovené látky, jejíž signál je statisticky odlišitelný od šumu.

**Mez stanovitelnosti, LOQ**

Mez stanovitelnosti je koncentrace, při které je přesnost stanovení dostatečná pro kvantitativní vyhodnocení.

**Citlivost**

Citlivost metody je změna odezvy měřicího zařízení, která odpovídá změně podnětu. Citlivost je při lineární závislosti rovna směrnici kalibrační závislosti. Pokud kalibrační závislost není lineární, mění se citlivost s koncentrací analytu.

**Opakovatelnost**

Opakovatelnost vyjadřuje, jak moc si jsou výsledky opakovaného měření stejného analytu podobné. Měření musí být provedena na stejném přístroji, na stejném místě, stejným postupem měření, stejným personálem a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.

**Lineární dynamický rozsah, LDR**

Lineární dynamický rozsah je rozsah použitých koncentrací, ve kterém je citlivost měřicího zařízení konstantní.

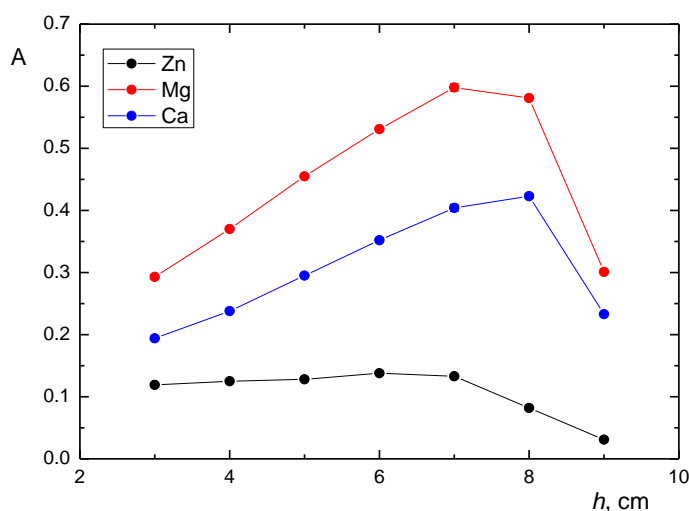
## 4 Výsledky a diskuze

V této části jsou prezentovány dosažené výsledky stanovení zinku, vápníku, hořčíku a selenu (resp. jejich iontů) v reálných vzorcích biologického materiálu. Nejprve jsou diskutovány optimalizace jak plamenové atomizace, tak atomizace za účasti tvorby hydridů. Následně jsou shrnuty základní charakteristiky a výsledky stanovení výše uvedených prvků v reálných vzorcích.

### 4.1 Stanovení Zn, Ca a Mg technikou F-AAS

#### 4.1.1 Optimalizace výšky hořáku

Před měřením vzorků byla provedena optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku tak, že byla proměřena závislost absorpance na jednotlivých polohách hořáku v rozmezí poloh hořáku 2 až 8 cm. K optimalizaci byl použit standardní roztok  $\text{Mg}^{2+}$  o koncentraci  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , standardní roztok  $\text{Ca}^{2+}$  o koncentraci  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  a standardní roztok  $\text{Zn}^{2+}$  o koncentraci  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Výsledky všech optimalizací jsou zobrazeny na Obr. 4.1.



Obr. 4.1 - Optimalizace výšky hořáku pro stanovení Zn, Mg a Ca

$$\begin{aligned}c_{\text{Zn}} &= 0,5 \text{ mg L}^{-1}, c_{\text{Mg}} = 0,5 \text{ mg L}^{-1}, c_{\text{Ca}} = 2,5 \text{ mg L}^{-1} \\ \lambda_{\text{Zn}} &= 213,9 \text{ nm}, \lambda_{\text{Mg}} = 285,2 \text{ nm}, \lambda_{\text{Ca}} = 422,7 \text{ nm} \\ v_{\text{Zn, Mg, Ca}} &= 0,5 \text{ nm} \\ u_{\text{acetylen}} &= 2 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 8 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{oxid dusný}} = 8 \text{ L hod}^{-1}\end{aligned}$$

Černá závislost zobrazuje závislost absorbance na výšce hořáku pro  $\text{Zn}^{2+}$ , modrá závislost zobrazuje závislost absorbance na výšce hořáku pro  $\text{Ca}^{2+}$ , červená závislost zobrazuje závislost absorbance na výšce hořáku pro  $\text{Mg}^{2+}$ .

Pro stanovení standardů a vzorků byly zvoleny pozice hořáku uvedené v *Tab. 4.1*, protože při nich byla naměřena nejvyšší odezva.

*Tab. 4.1 - Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku*

<b>Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku</b>			
prvek	Mg	Ca	Zn
Optimální pozice hořáku (cm)	6	7	6
Naměřená absorbance	0,598	0,423	0,138

#### **4.1.2 Kalibrační závislosti pro Mg, Ca a Zn**

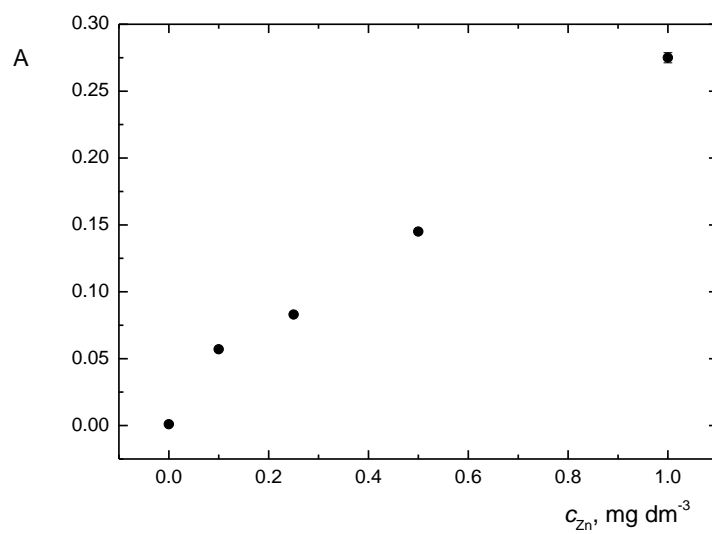
Absorbance kalibračních roztoků byla měřena s použitím příslušné výbojky s dutou katodou, byla tedy změřena při vlnové délce charakteristické pro každý stanovovaný prvek. Z naměřených hodnot signálů byly sestrojeny kalibrační závislosti absorbance na koncentraci standardů.

##### ***Kalibrační závislost pro stanovení zinku***

Standardní roztoky  $\text{Zn}^{2+}$  byly měřeny bez přidání pomocných činidel. Byly proměřeny roztoky o koncentracích 0,10; 0,25; 0,50 a 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  a ze získaných hodnot absorbancí byla sestrojena kalibrační závislost (viz *Obr. 4.2*).

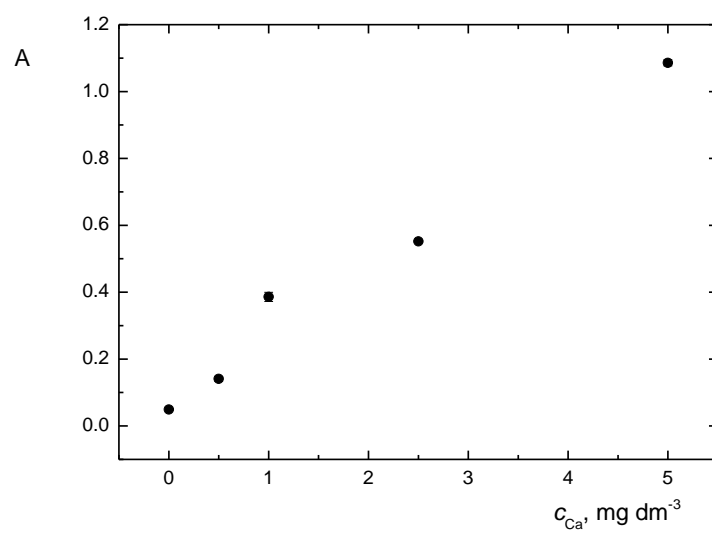
##### ***Kalibrační závislost pro stanovení vápníku***

Standardní roztoky  $\text{Ca}^{2+}$  byly měřeny s přidáním pomocného činidla KCl. K 10 mL roztoku standardu byly přidány 0,4 mL roztoku KCl o dané koncentraci. Takto byly proměřeny roztoky o koncentracích 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0  $\text{mg L}^{-1}$  a ze získaných hodnot absorbancí byla sestrojena kalibrační závislost (viz *Obr. 4.3*).



*Obr. 4.2 - Závislost absorbance na koncentrácii zinku*

$\lambda_{\text{Zn}} = 213,9 \text{ nm}$ ,  $\nu = 0,5 \text{ nm}$ ,  $I = 5 \text{ mA}$ ,  $u_{\text{acetylen}} = 2 \text{ L hod}^{-1}$ ,  $u_{\text{vzduch}} = 8 \text{ L hod}^{-1}$

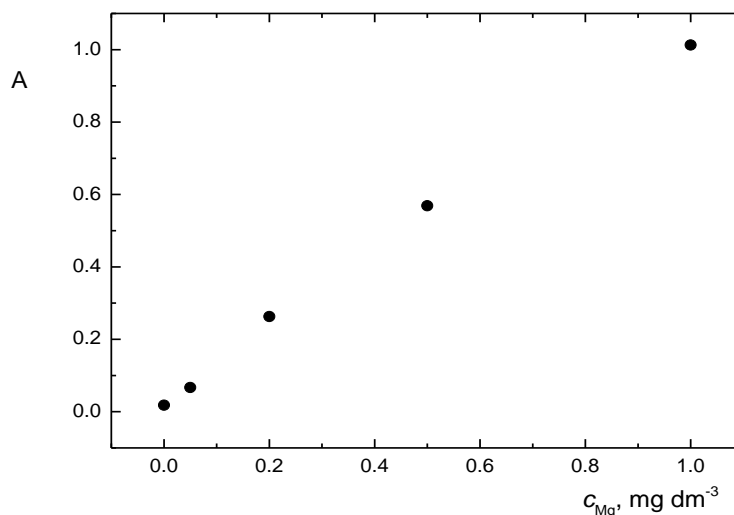


*Obr. 4.3 - Závislost absorbance na koncentrácii vápníku*

$\lambda_{\text{Ca}} = 422,7 \text{ nm}$ ,  $\nu = 0,5 \text{ nm}$ ,  $I = 10 \text{ mA}$ ,  $u_{\text{acetylen}} = 2 \text{ L hod}^{-1}$ ,  $u_{\text{oxid dusný}} = 8 \text{ L hod}^{-1}$

### ***Kalibrační závislost pro stanovení hořčíku***

Standardní roztoky  $\text{Mg}^{2+}$  byly měřeny s přidáním pomocného činidla KCl. K 10 mL roztoku standardu byly přidány 0,4 mL roztoku KCl o dané koncentraci. Takto byly proměřeny roztoky o koncentracích 0,05; 0,20; 0,50 a 1,0  $\text{mg L}^{-1}$  a ze získaných hodnot absorbancí byla sestrojena kalibrační závislost (viz *Obr. 4.4*).



*Obr. 4.4 - Závislost absorbance na koncentraci hořčíku*

$$\lambda_{\text{Mg}} = 285,2 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, I = 10 \text{ mA}, u_{\text{acetylen}} = 2 \text{ L hod}^{-1}, u_{\text{vzduch}} = 8 \text{ L hod}^{-1}$$

#### **4.1.3 Charakteristika metody**

Po naměření optimalizace výšky hořáku a kalibračních závislostí byly následně určeny statistické údaje, které jsou potřeba k určení charakteristiky dané metody. Byla stanovena mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, citlivost, lineární dynamický rozsah, korelační koeficient a pracovní rozsah. K určení těchto parametrů byly využity kalibrační závislosti pro každý jednotlivý prvek Zn, Ca a Mg. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4.2*.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla spočtena z údajů získaných naměřením kalibračního roztoku zinku o koncentraci 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ , vápníku o koncentraci 0,25  $\text{mg L}^{-1}$ , a hořčíku o koncentraci 0,05  $\text{mg L}^{-1}$ . Každý kalibrační roztok byl měřen desetkrát.

Opakovatelnost byla spočtena z údajů získaných naměřením kalibračního roztoku zinku a hořčíku o koncentraci  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  a vápníku o koncentraci  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Každý kalibrační roztok byl měřen desetkrát.

Citlivost metody byla určena na základě kalibrační závislosti, která byla vynesena do grafu. Lineární část byla poté proložena přímkou lineární regrese a získaná směrnice kalibrační přímky odpovídala právě citlivosti metody. Z této kalibrační závislosti byly dále určeny korelační koeficienty, pracovní rozsah a lineární dynamický rozsah dané metody.

Tab. 4.2 – Shrnutí základních charakteristik stanovení vybraných prvků technikou F-AAS

Charakteristiky metody			
	zinek	vápník	hořčík
Mez detekce <sup>I</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ ) $\cdot 10^3$	6,01 <sup>B</sup>	15,51 <sup>C</sup>	2,47 <sup>A</sup>
Mez stanovitelnosti <sup>II</sup> ( $\text{mg L}^{-1}$ ) $\cdot 10^3$	20,03 <sup>B</sup>	51,7 <sup>C</sup>	8,23 <sup>A</sup>
Opakovatelnost %	0,719 <sup>D</sup>	0,988 <sup>E</sup>	0,475 <sup>D</sup>
Citlivost ( $\text{L mg}^{-1}$ )	0,3899	0,2790	1,135
Korelační koeficient	0,9899	0,9216	0,9998
LDR do ( $\text{mg L}^{-1}$ )	4,0	10	3,0
Pracovní rozsah do ( $\text{mg L}^{-1}$ )	5,0	10	5,0

I -  $3\sigma$  kritérium, II -  $10\sigma$  kritérium, A - pro  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , B - pro  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , C - pro  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ , D - pro  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ , E -  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$

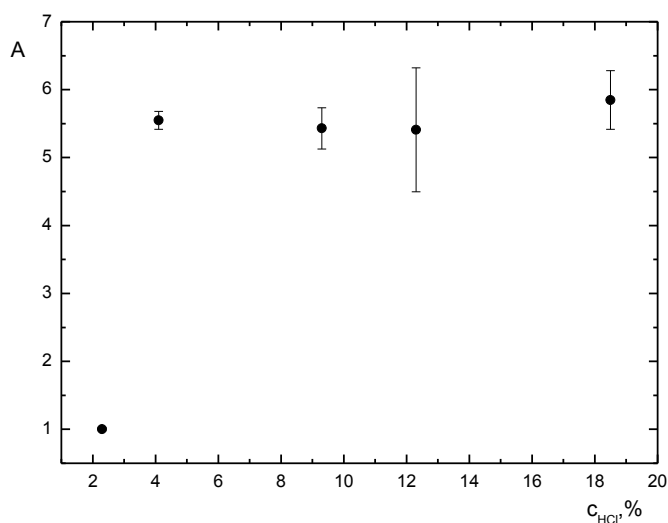
## 4.2 Stanovení selenu technikou HG-AAS

### 4.2.1 Optimalizace metody

Před stanovením selenu v roztocích vzorků bylo nutné provést optimalizaci koncentrace HCl, koncentrace  $\text{NaBH}_4$  a rychlosti průtoku vzorku. K optimalizaci byl použit roztok selenu o koncentraci  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , průtok argonu byl  $5 \text{ L hod}^{-1}$ .

#### **Koncentrace HCl**

Pro optimalizaci koncentrace HCl byly vybrány roztoky HCl o koncentracích 2, 4, 9, 12 a 18 %. Z grafu na Obr. 4.5 plyne, že nejvyšší absorbance byla naměřena u 18% roztoku HCl. Tento roztok byl proto dále použit ke stanovení selenu v roztocích vzorků.

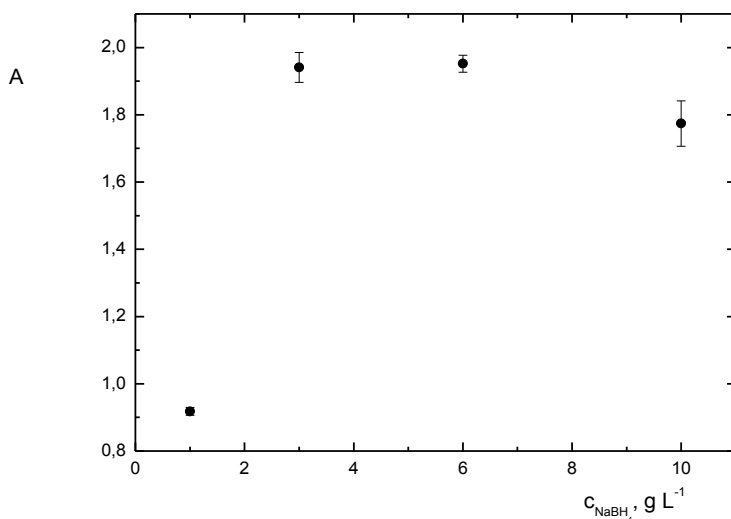


*Obr. 4.5 - Závislost absorbance na koncentraci HCl*

$c_{\text{Se}} = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Se}} = 196,1 \text{ nm}$ ,  $\nu = 0,5 \text{ nm}$ ,  $c_{\text{NaBH}_4} = 6,0 \text{ g L}^{-1}$ ,  $t_{\text{atomizátor}} = 950^\circ\text{C}$ ,  
 $u_{\text{argon}} = 5 \text{ L hod}^{-1}$

#### **Koncentrace $\text{NaBH}_4$**

Pro optimalizaci koncentrace  $\text{NaBH}_4$  byly použity roztoky připravené rozpuštěním 1,0; 3,0; 6,0; a 10 g  $\text{NaBH}_4$  a 5 g  $\text{NaOH}$  v 1 litru deionizované vody. Z grafu na *Obr. 4.6* plyne, že nejvyšší absorbance byla naměřena při koncentraci  $\text{NaBH}_4$   $6,0 \text{ g L}^{-1}$  (0,6 %). Tento roztok byl proto dále použit pro stanovení selenu v roztocích vzorků.

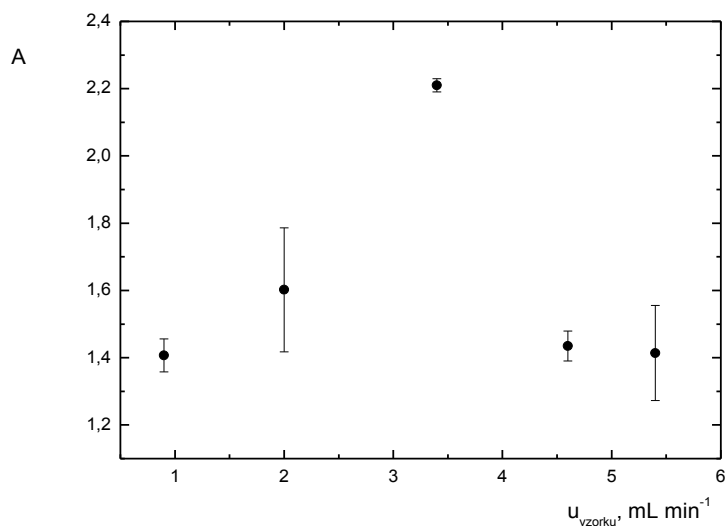


*Obr. 4.6 - Závislost absorbance na koncentraci  $\text{NaBH}_4$*

$c_{\text{Se}} = 10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Se}} = 196,1 \text{ nm}$ ,  $\nu = 0,5 \text{ nm}$ ,  $c_{\text{HCl}} = 18 \%$ ,  $t_{\text{atomizátor}} = 950^\circ\text{C}$ ,  
 $u_{\text{argon}} = 5 \text{ L hod}^{-1}$

#### 4.2.1.1 Rychlost průtoku vzorku

Rychlost průtoku vzorku závisí na průměru použité čerpací hadičky. Z Obr. 4.7 plyne, že nejvyšší absorbance byla naměřená při průtoku  $3,4 \text{ mL min}^{-1}$ , což odpovídá průměru hadičky  $1,65 \text{ mm}$ .



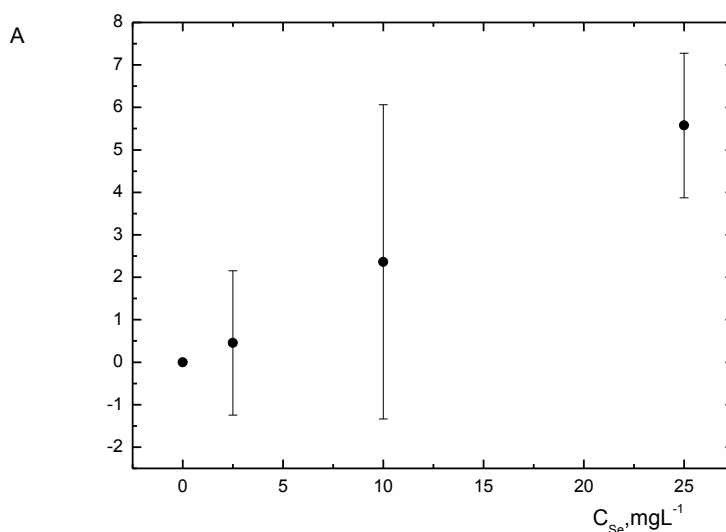
Obr. 4.7 - Závislost absorbance na průtokové rychlosti vzorku

$$c_{\text{Se}} = 10 \mu\text{g L}^{-1}, \lambda_{\text{Se}} = 196,1 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, c_{\text{HCl}} = 18 \%, c_{\text{NaBH}_4} = 6,0 \text{ g L}^{-1}, \\ t_{\text{atomizátor}} = 950^\circ\text{C}, u_{\text{argon}} = 5 \text{ L hod}^{-1}$$

#### 4.2.2 Kalibrační závislost

Pro stanovení kalibrační závislosti byly připraveny standardní roztoky  $\text{Se}^{4+}$  o koncentracích 1,0; 2,5; 5; a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Příprava těchto roztoků je popsána v kap. 3.4.1. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka (viz Obr. 4.8).





Obr. 4.8 - Závislost absorbance na koncentraci selenu

$$\lambda_{\text{Se}} = 196,1 \text{ nm}, \nu = 0,5 \text{ nm}, c_{\text{HCl}} = 18 \%, c_{\text{NaBH}_4} = 6,0 \text{ g L}^{-1}, t_{\text{atomizátor}} = 950^\circ\text{C}, \\ u_{\text{argon}} = 5 \text{ L hod}^{-1}$$

#### 4.2.3 Charakteristika metody

Po naměření optimalizací a kalibrační závislosti byly následně určeny statistické údaje, které jsou potřeba k určení charakteristiky dané metody. Byla stanovena mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, citlivost, lineární dynamický rozsah, korelační koeficient a pracovní rozsah. K určení těchto parametrů byla využita kalibrační závislost pro Se. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 4.3.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla spočtena z údajů získaných naměřením kalibračního roztoku selenu o koncentraci  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , který byl měřen desetkrát.

Opakovatelnost byla spočtena z údajů získaných naměřením kalibračního roztoku selenu o koncentraci  $150 \mu\text{g L}^{-1}$ , který byl měřen desetkrát.

Citlivost metody byla určena za základě kalibrační závislosti, která byla vynesena do grafu. Lineární část byla poté proložena přímkou lineární regrese a získaná směrnice kalibrační přímky odpovídala právě citlivosti metody. Z této kalibrační závislosti byly dále určeny korelační koeficienty, pracovní rozsah a lineární dynamický rozsah dané metody.

Tab. 4.3 - Shrnutí základních charakteristik stanovení selenu technikou HG-AAS

Charakteristika metody	
	selen
Mez detekce <sup>I</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,50 <sup>A</sup>
Mez stanovitelnosti <sup>II</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1,65 <sup>A</sup>
Opakovatelnost %	1,64 <sup>B</sup>
Citlivost ( $\text{L } \mu\text{g}^{-1}$ )	0,0071
Korelační koeficient	0,9913
LDR do ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	100
Pracovní rozsah do ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	250
I - $3\sigma$ kritérium, II - $10\sigma$ kritérium, A – pro $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , B - pro $150 \mu\text{g L}^{-1}$	

### 4.3 Stanovení vzorků

Měřených vzorků bylo 18 a byly označeny písmeny A – Q (včetně Ň). Před stanovením reálných vzorků byly nastaveny zjištěné optimální parametry pro obě metody stanovení F-AAS a HG-AAS. Výsledky všech měření jsou uvedeny v Tab 4.4.

Pro stanovení zinku byly použity nezředěné vzorky, bez přídavku pomocných činidel.

Pro stanovení vápníku a hořčíku byly použity vzorky 1000x zředěné, protože 10x zředěné vzorky poskytovaly velmi velký signál. U všech vzorků bylo k 10 ml vzorku přidáno 0,4 ml KCl.

Pro stanovení selenu byly použity nezředěné vzorky a pomocné roztoky HCl (18%) a  $\text{NaBH}_4$  (koncentrace  $6 \text{ g L}^{-1}$ ), průtok argonu byl  $5 \text{ L } \text{hod}^{-1}$ .

Tab. 4.4. - Výsledky stanovení vybraných prvků ve vzorcích rostlin

Vzorek	Koncentrace prvků							
	(mg g <sup>-1</sup> )						(μg kg <sup>-1</sup> )	
	zinek	±	vápník	±	hořčík	±	selen	±
Hluchavka	0,33	0,002	17,0	0,50	9,23	0,05	52,4	5,13
Jitrocel kopinatý	0,41	0,006	52,2	0,59	5,85	0,02	36,1	1,12
Jitrocel kopinatý - listy	0,44	0,005	34,3	0,58	4,34	0,14	43,2	3,98
Lesní jahoda	0,24	0,004	59,4	1,00	4,60	0,06	13,4	0,75
Levandule	0,55	0,002	25,6	0,40	5,05	0,10	58,2	0,87
Máta	0,39	0,006	49,4	0,59	5,35	0,06	18,7	0,49
Mateřídouška	0,71	0,001	30,0	0,64	5,37	0,09	17,0	0,32
Oregáno	0,41	0,004	26,5	0,24	4,49	0,10	35,6	1,60
Řebříček	0,33	0,005	2,76	0,13	2,76	0,07	11,8	0,60
Řebříček - listy	0,22	0,019	20,5	0,44	4,01	0,02	478	13,9
Řepík	0,31	0,005	15,7	1,31	4,15	0,05	469	5,62
Routa vonná	0,48	0,002	53,4	0,49	5,43	0,04	53,4	5,29
Šalvěj	0,76	0,005	49,0	0,41	7,12	0,09	339	6,78
Smetánka	0,55	0,002	11,0	0,17	3,55	0,03	27,4	0,58
Stévie	0,76	0,013	17,7	0,49	6,34	0,04	326	8,16
Vlaštovičník	0,31	0,003	11,0	0,12	2,95	0,03	352	7,40
Routa - semena	0,50	0,007	28,3	0,51	2,64	0,05	25,9	0,36
Meduňka	0,27	0,001	29,7	0,56	4,17	0,08	661	25,1

Z naměřených výsledků je zřejmé, že nejvyšší zastoupení zinku bylo naměřeno v šajvěji a stévii a naopak nejnižší v listech řebříčku. Při analýze naměřených dat je vidět, že v některých rostlinách byla zjištěna téměř shodná množství zinku. Např. v mateřídoušce bylo zjištěno množství zinku jen o několik setin menší, než v šalvěji a stévii. Podobné výsledky lze také sledovat mezi vzorky levandule a smetánky a mezi vzorky lesní jahody, meduňky a listů řebříčku.

Nejvyšší zastoupení vápníku bylo naměřeno v lesní jahodě, a naopak nejnižší v řebříčku. Obecně by se dalo říct, že jitrocel kopinatý, máta, routa vonná a šalvěj obsahují také poměrně vysoké množství vápníku, oproti ostatním zkoumaným rostlinám.

Nejvyšší zastoupení hořčíku bylo zjištěno v hluchavce a nejnižší v semenech routy, řebříčku a vlaštovičníku.

Nejvyšší zastoupení selenu bylo naměřeno v meduňce, naopak nejnižší hodnota byla naměřena v řebříčku, ne však v jeho listech. Oproti ostatním zkoumaným rostlinám obsahují listy řebříčku, řepík, šalvěj, stévie a vlaštovičník poměrně vysoké množství selenu, i přes to, že jsou tato množství mnohem menší, než množství selenu nalezené v meduňce. V *Tab. 4.5* je shrnuto, v které rostlině bylo nalezeno nejvyšší zastoupení jednotlivých prvků.

*Tab. 4.5 - Majoritní zastoupení prvků*

<b>prvek</b>	<b>rostlina</b>
zinek	šalvěj, stévie
vápník	lesní jahoda
hořčík	hluchavka
selen	meduňka

## 5 Závěr

Pro stanovení zinku, vápníku a hořčíku pomocí atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací a pro stanovení selenu pomocí atomové absorpční spektrometrie s technikou chemického generování těkavých hydridů byly provedeny optimalizace stanovení jednotlivých prvků. Bylo stanoveno množství jednotlivých prvků v 18 rostlinných vzorcích, které byly připraveny rozkladem pevného vzorku v mikrovlnném zařízení působením kyseliny dusičné.

Nejvyšší obsah zinku byl zjištěn v šalvěži ( $0,76 \text{ mg g}^{-1}$ ) a ve stévii ( $0,76 \text{ mg g}^{-1}$ ). V mateřídoušce ( $0,71 \text{ mg g}^{-1}$ ) byl obsah zinku také poměrně vysoký. Vápníku bylo nejvíce v lesní jahodě ( $59,4 \text{ mg g}^{-1}$ ), ale dalo by se říct, že i v jitrocelu kopinatém ( $52,2 \text{ mg g}^{-1}$ ), mátě ( $49,4 \text{ mg L}^{-1}$ ), routě vonné ( $53,4 \text{ mg g}^{-1}$ ) a šalvěži ( $49 \text{ mg g}^{-1}$ ) bylo zastoupení tohoto prvku poměrně vysoké vzhledem k jeho obsahu v ostatních rostlinách. Nejvyšší zastoupení hořčíku bylo zjištěno v hluchavce ( $9,23 \text{ mg g}^{-1}$ ). Nejvíce selenu bylo naměřeno v meduňce ( $661 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), ale poměrně vysoké množství tohoto prvku bylo naměřeno také v listech řebříčku ( $478 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), řepíku ( $469 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), šalvěži ( $339 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ), stévii ( $326 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ) a vlašovičniku ( $352 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ).

## 6 Zdroje

- [1] Sofrová D. a kolektiv: *Biochemie. Základní kurz*, 4.vydání, Praha, Karolinum (2009)
- [2] Suliburska J.: Herbal infusions as a source of calcium, magnesium, iron, zinc and copper in human nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **63** (2), 194-198 (2012)
- [3] Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, UK Praha, Karolinum (2002)
- [4] Fairweather-Tait S. J., Bao Y., Broadley M. R., Collings R., Ford D., Hesketh J. E., Hurst R.: Selenium in Human Health and Disease, *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**:7, 1337-1383 (2011)
- [5] Rayman M. P., Selenium and human health, *The Lancet*, **379**, 1256-1268 (2012)
- [6] Barciela García J., Kracher M., Chen B., Shotyk W.: Improved determination of selenium in plant and peat generation – atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS), *Analytica chimica acta*, **534**, 255-261 (2005)
- [7] Smrkolj P., Stibilj V.: Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **512**(1), 11-17 (2004)
- [8] Askary V.R., Jahan N.A., Sabbagh A., Jahani F.S., Dourandish N., Kamachali A.R.K.: A potential medicinal importance of zinc in human health and chronic diseases, *Clinical biochemistry*, **44**:13, 323-324 (2011)
- [9] Maret W.: Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis: Recent Insights and Current trends, *Biometals*, **14**, 187-190 (2001)
- [10] Wessels K.R., Estimating the Global Prevalence of Zinc Deficiency: Results Based on Zinc Availability in National Food Supplies and the Prevalence of Stunting. *PLoS One*, **7**(11) (2012)
- [11] Brown K.H., Wuehler S.E., Peerson J.M.: The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency, *Food & Nutrition Bulletin*, **22**:2, 113-125 (2001)
- [12] GUPTA, U C. Sources and Deficiency Diseases of Mineral Nutrients in Human Health and Nutrition: A Review. *An International Journal Pedosphere*. **24**(1), 13-38 (2014)

- [13] Kittnar O. a kolektiv: *Lékařská fyziologie*, Praha, Grada Publishing (2011)
- [14] Novák F.: *Úvod do klinické biochemie*, Praha, Karolinum (2002)
- [15] Pinsky R.M., Brochard L., Mancebo J. (edits): *Applied Physiology in Intensive Care Medicine*, Berlin, Springer-Verlang (2006)
- [16] Beaty R.D., Kerber J. D.: *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, 2<sup>nd</sup> ed., Norwalk, The Perkin – Elmer Corporation (1993)
- [17] Chen J., Teo K. Ch.: Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spektrometry after cloud point extraction, *Analytica Chimica Acta*, **450**: 1-2, 215-222 (2001)
- [18] Dionísio A. G. G., Dantas de Jesus A. M., Amais R. S., Donati G. L., Miranda K., Guerra M. B. B., Nóbrera J. A., Pereira-Filho E. R.: Old and New Flavors of flame (Furnace) Atomic Absorption Spectrometry, *International Journal of Spectroscopy*, 2011: 262715, 30 pages (2011)
- [19] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I., 2. vydání*, Praha, Karolinum (2004)
- [20] Kealey D., Haines P. J.: *Analytical chemistry*, Instant notes chemistry series, Oxford, BIOS (2002)
- [21] Ebdon L., Evans E. H., Fisher A., Hills S. J.: *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*, Weinheim, John Wiley & Sons (1998)
- [22] J. E. Cantle (edit.): *Atomic Absorption Spectrometry*, Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Company (1982)
- [23] D'Ulivo A.: Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report), *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 69, 67 – 68 (2012)